

Г. А. ШАЛАХМЕТОВА

ААОЗ-АЛЬДЕГИДОКСИДАЗА – ПОКАЗАТЕЛЬ УСТОЙЧИВОСТИ ПРЕДУБОРОЧНОГО ПРОРАСТАНИЯ В ЗЕРНЕ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ

(Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхоксина)

Проведено сравнительное изучение активности ААОЗ зерна разных сортов пшеницы под воздействием пониженной температуры и повышенной влажности. Выявлены устойчивые сорта пшеницы к предуборочному прорастанию. Разработан биохимический метод точной диагностики явления предуборочного прорастания.

При неблагоприятных климатических условиях, повышенная влажность, пониженная и повышенная температуры, в созревающем семени неустойчивых сортов к прорастанию появляется эффект так называемого предуборочного прорастания или прорастания в колосе. В такие неблагоприятные для формирования урожая годы, что характерно для климатических условий северных, центральных и восточных районов Казахстана,

снижается качество зерна пшеницы. От снижения качества зерна, за счет прорастания в колосе, урожай зерновых терпит значительные потери. Установлено, что подверженность пшеницы к прорастанию в колосе зависит от генотипа [1].

В последние годы проводились исследования по изучению механизмов установления покоя семян и ингибирования прорастания в злаковых культурах. Этот процесс регулирует фитогормон

секвiterпеновой природы - абсцизовая кислота (АБК). Американские ученые и другие показали, что процесс покоя семян редуцируется низким уровнем АБК [2]. Многими физиологами была показана роль АБК в контролировании процессов покоя и прорастания [3, 4]. Прорастание зерна в колосе в период созревания или при хранении индуцируется синтезом фермента б-амилазы «прорастания», что приводит к гидролизу крахмала и образованию водорастворимых декстринов, которые ухудшают качество зерна [5, 6]. В ряде работ было выявлено, что добавление АБК в физиологических концентрациях к развивающимся эмбрионам некоторых видов злаковых приводило к предупреждению преждевременного прорастания через блокирование экспрессии специфических ферментов прорастания. Как показано рядом исследований последних лет, факторами устойчивости или подверженность к прорастанию зерна пшеницы в колосе не только связаны с синтезом б-амилазы «прорастания» в созревающем зерне, но и с ферментом, участвующим в биосинтезе АБК, альдегидоксидазой, в каталитический центр которого входит молибденовый кофактор.

Таннер [7] показал, что некоторые сорта кукурузы, склонные к прорастанию, обработанные раствором молибдена предупреждают прорастание семян. Дальнейшие исследования, подтверждающие, что молибден вовлечен в процесс прорастания и поддержания покоя семян были опубликованы группой ученых Фарувелл и др. [8], Кэрнс и др. [9]. В настоящее время показано, что молибден играет ключевую роль в процессе индукции и поддержании покоя семян и входит в состав молибденового кофактора молибденсодержащих ферментов, таких как альдегидоксидаза (АО), нитратредуктаза, ксантиндегидрогеназа и др. [10].

Показано, что увеличение активности АО в семенах пшеницы коррелирует с увеличением содержания АБК в период созревания зерна [11]. Установлено, что мутанты томата и ячменя, дефицитные по Мо-со, почти не способны синтезировать АБК [12]. Ранее нами было показано, что устойчивый сорт Лютесценс-70 обладает более высоким содержанием АБК и активностью АО, чем чувствительный к прорастанию сорт Новосибирская-67 [13].

Исследования последних лет показывают, что в арабидопсисе в спектре альдегидоксидазы существует 4 формы изоферментов [14]. Срав-

нительное исследование альдегидоксидаз арабидопсиса показали, что основной функцией изофермента ААОЗ в листьях, в условиях стресса является биосинтез АБК и с другой стороны они показали, что в семенах арабидопсиса этот же изофермент ААОЗ вовлечен в биосинтез этого гормона [15].

В настоящей работе по изучению активности АО в сортах пшеницы, районированных по Казахстану, показана сравнительная активность ААОЗ и спектры изоизомов АО, в созданных искусственно-климатических условиях, индуцирующих прорастание семян (повышенная влажность, пониженная температура).

Выявлены устойчивые сорта пшеницы к предуборочному прорастанию, разработан чувствительный биохимический метод точной диагностики этого явления.

Материалы и методы

В работе были использованы семена 12 сортов мягкой пшеницы, районированные в Казахстане: Казахстанская 10, Казахстанская раннеспелая, Лютесценс 70, Лютесценс 157, Лютесценс 462, Лютесценс 314, Саратовская 29, Алмацен, Кайыр, Скарлет, а также линии озимой пшеницы №132 и

№ 138. Семенной материал урожая 2007 г. был предоставлен КазНИИ Земледелия и Растениеводства.

Для создания модельных климатических условий семена помещали в климокамеру с дневной $t = 25^{\circ}\text{C}$, ночной $t = 10^{\circ}\text{C}$ и постоянным значением влажности – 80 %.

Контрольными образцами, служили семена пшеницы не подвергнутые обработке. В опытных образцах определяли активность ААОЗ на 3-й, 7-й, 10-й день. Семена пшеницы 1 г растягивали в 250 мМ трис-HCl буфере, pH 8,0; 1 мМ ЕДТА, 10 мМ ДТТ в соотношении 1:3. Гомогенизованный растительный материал центрифугировали при 10 000 об/мин при 4°C в течение 30 мин. Полученный супернатант подвергался нативному электрофорезу в ПААГ 7% полиакриламидного геля в буферной системе по Laemmli [16]. После электрофореза гель окрашивали в смеси содержащей, 0,05 М трис- HCl, pH 7,5; 0,1 мМ феназинметосульфат, 1 мМ МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) и 1 мМ субстрат, в качестве субстрата использовали бензальдегид. АО активность определялась

на основе восстановления МТТ, которая приводила к развитию специфических формазановых полос фермента. Относительная интенсивность окрашенных формазановых полос была прямо пропорциональна активности фермента АО. Интенсивность окрашенных полос определялась по электронной программе Scion Image.

Результаты и обсуждение

Абсцисовая кислота (АБК) играет ключевую роль в ответных реакциях растений и адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды. Сравнительно недавно выяснено, что важным звеном в биосинтезе АБК является фермент альдегидоксидаза (АО), катализирующий последний этап синтеза фитогормона [17]. Японскими учеными показано, что изозим ААО3

вовлечен в биосинтез АБК в семенах арабидопсиса [15]. Нами измерялась оптическая плотность (ОП), по программе Scion Image, формазановых полос изофермента ААО3, которая прямо пропорциональна активности фермента, в семенах разных сортов пшеницы [18].

На рис. 1 представлен спектр изоферментов АО контрольных образцов. Как видно из рисунка все проанализированные образцы пшеницы имели в электрофоретическом спектре изофермент ААО3. Устойчивые сорта проявили высокую активность ААО3: Алмакен, Скарлет, Кайыр и № 138 линии озимой пшеницы и минимальную активность ААО3 показали неустойчивые сорта: Казахстанская раннеспелая, Лютесценс-157, Саратовская-29, №132 линии озимой пшеницы.

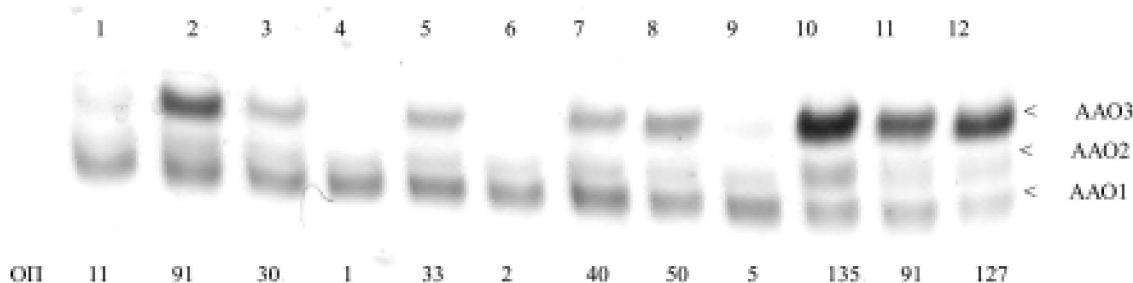


Рис. 1. Активность ААО3 в зерне контрольных образцов пшеницы: 1 – линия озимой пшеницы №132; 2 – линия озимой пшеницы №138; 3 – Казахстанская 10; 4 – Казахстанская раннеспелая; 5 – Лютесценс-314; 6 – Лютесценс-157; 7 – Лютесценс-462; 8 – Лютесценс-70; 9 – Саратовская-29; 10 – Алмакен; 11 – Кайыр; 12 – Скарлет

На 3-й день эксперимента, в условиях повышенной 80% влажности и ночной температуры 10°C, активность ААО3 снижается у всех сортов пшеницы, и падает до 0 у неустойчивых сортов – Казахстанская раннеспелая, Лютес-

ценс-157, Саратовская-29 и сорт №132 линии озимой пшеницы пока-зывает максимально низкую активность ААО3 , устойчивые сорта теряют активность фермента – незначительно (рис. 2).

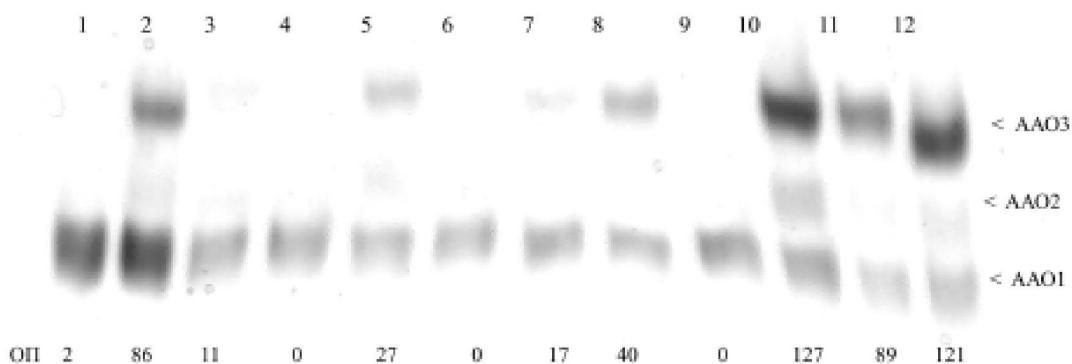


Рис. 2. Влияние повышенной влажности и пониженной температуры на активность ААО3 зерна различных сортов пшеницы: 1 – линия озимой пшеницы №132; 2 – линия озимой пшеницы №138; 3 – Казахстанская 10; 4 – Казахстанская раннеспелая; 5 – Лютесценс-314; 6 – Лютесценс-157; 7 – Лютесценс-462; 8 – Лютесценс-70; 9 – Саратовская-29; 10 – Алмакен; 11 – Кайыр; 12 – Скарлет

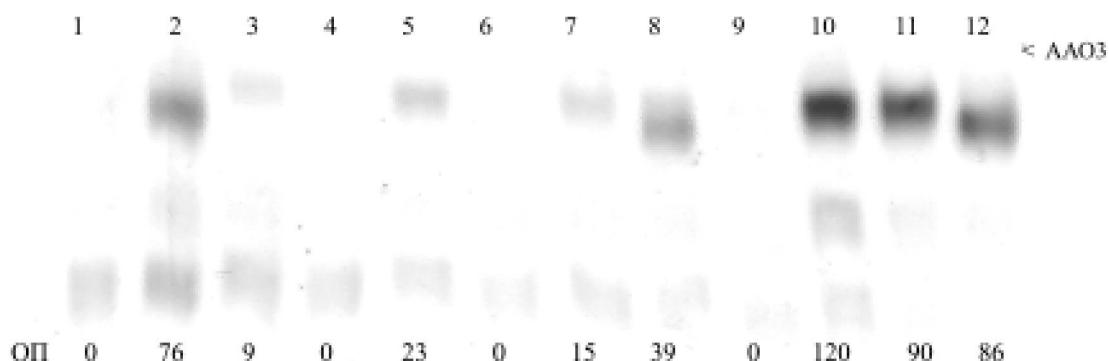


Рис. 3. Влияние повышенной влажности и пониженной температуры на активность ААО3 зерна различных сортов пшеницы: 1 – линия озимой пшеницы №132; 2 – линия озимой пшеницы №138; 3 – Казахстанская 10; 4 – Казахстанская раннеспелая; 5 – Лютесценс-314; 6 – Лютесценс-157; 7 – Лютесценс-462; 8 – Лютесценс-70; 9 – Саратовская-29; 10 – Алмакен; 11 – Кайыр; 12 – Скарлет

Как видно на рис. 3, на 7-й день эксперимента продолжается уменьшение активности ААО3, устойчивые сорта пшеницы показывают снижение активности фермента только на 5-10 % по сравнению с контрольными образцами: Алмакен, Кайыр, Скарлет, №138. Интересно, что сорта: Лютесценс-70 и Лютесценс-314, Лютесценс-462 показали высокую устойчивость к не-

благоприятным стрессовым условиям на протяжении всего периода проведения эксперимента, хотя активность ААО3 этих сортов меньше в 2-3 раза активности этого изоизима у устойчивых сортов.

Результаты по выявлению устойчивых сортов пшеницы, на 10-й день эксперимента, показаны на рис. 4.

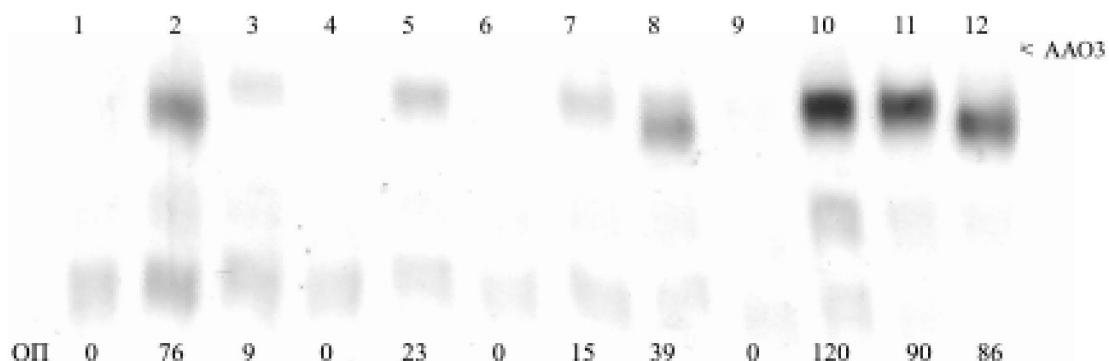


Рис. 4. Влияние повышенной влажности и пониженной температуры на активность ААО3 зерна различных сортов пшеницы: 1 – линия озимой пшеницы №132; 2 – линия озимой пшеницы №138; 3 – Казахстанская 10; 4 – Казахстанская раннеспелая; 5 – Лютесценс-314; 6 – Лютесценс-157; 7 – Лютесценс-462; 8 – Лютесценс-70; 9 – Саратовская-29; 10 – Алмакен; 11 – Кайыр; 12 – Скарлет

На 10-й день проведения эксперимента устойчивый сорт Алмакен, показал самую высокую активность ААО3, по сравнению с другими сортами пшеницы. Как видно из рис. 4, в своем спектре изоизомов АО в устойчивых сортах сохраняется изофермент ААО3.

На основании полученных результатов можно сказать, что после обработки семян пшеницы, в условиях, индуцирующих прорастание, уже

на 3-й день у неустойчивых сортов пшеницы активность ААО3 упала до минимума. Устойчивые же сорта показывали высокую активность ААО3 на протяжении всего периода эксперимента.

Таким образом, можно отметить, что именно присутствие в электрофоретическом спектре изофермента с высокой активностью ААО3 свидетельствует об устойчивости этих форм пшеницы к предуборочному прорастанию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Person E. Cereal. Res. Commun. 1976. V. 4, №2. P. 101-107.
2. Walker-Simmons M. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. Plant Physiol. 1987. V. 84. P. 41-46.
3. Quatrano R.S., Ballo B.L., Williamson J.D., Hamblin M.T., Mansfield M. ABA controlled expression of embryo-specific genes during wheat grain developing // Goldberg R. ed. Plant molecular biology. New-York: Liss Inc., 1983. P. 243-353.
4. Walker-Simmons M., Kudra D.A., Warner R.L. Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley // Plant Physiol. 1988. V. 90. P. 728-733.
5. Kruger J.E. Biochemistry of pre-harvest sprouting in cereals and practical application in plant breeding. Cereal Res. Commun., 1976. V.4. P.187-194.
6. Mansour K. Sprout damage in wheat and its effect on wheat flour product // Walker-Simmons M.K., Ried J.L. (eds). Preharvest sprouting in cereals. 1992. P. 8-9.
7. Tanner P.D. A relationship between premature sprouting on the cob and molybdenum and nitrogen status of maize grain // Plant and soil. 1978. V. 49. P. 427-432.
8. Farwell A.J., Farina M.P.W., Channon P. Soil acidity effects on premature germination in immature maize grain // Wright R.J., Baligar V.C., Murrman R.P. eds. Plant Soil Interactions at low pH. P. 355-361. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
9. Cairns A.L.P., Kitzinger J.H., Modi A.T., Cowan A.K. The role of molybdenum in the induction of dormancy and mitigation of preharvest sprouting damage. 7th Intern. Symp. On Preharvest Sprouting in Cereals. 1995. P. 105.
10. Alkulov Z., Shiemann J. Presence of molybdenum co-factor in dry seeds of wheat and barley // Plant Sci. 1985. V. 40. P. 161-165.
11. Kawakami N., Miyake Y., Kazuhiko N. ABA sensitivity and low ABA levels during seed development of non-dormant wheat genotypes // J. Exp. Bot. 1997. V. 48(312). P. 1415-1421.
12. Taylor I.B., Linforth R.S.T., Al-Naieb R.G., Bowman W.R., Marples B.A. The wilty tomato mutants flacca and sitiens are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA // Plant Cell and Environment. 1988. V. 11. P. 739-745.
13. Шалахметова Г.А., Ыргынбаева Ш.А., Мамытова Н.А., Галиева Л.А., Кузовлев В.А., Хакимжанов А.А. Фитогормональная регуляция процессов покоя и прорастания зерна пшеницы // Вестник. 2006.
14. Zdunek-Zastocka E., Omarov R.T., Koshiba T., Lips S. Activity and protein level of AO isoforms in pea plants (*Pisum sativum* L.) during vegetative development and in response to stress conditions // J. Exp. Bot. 2004. V. 55, N 401. P. 1361-1369.
15. Seo M., Aoki H., Koizumi H., Kamiya Y., Nambara E., Koshiba T. Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (AAO3) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45(11). P. 1694-1703.
16. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T. 4. Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.
17. Rock C. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression // New Phytol. 2002. V. 148. P. 357-396.
18. Rothe G.M. Aldehyde oxidase isoenzymes (EC 1.2.3.1) in potato tubers (*Solanum tuberosum*) // Plant Cell Physiology. 1974. V. 15. P. 493-499.

Резюме

Казақстанда өсірілетін әртүрлі бидай сұрыптарының дәндериңдегі АБК-АО фермен-тінің белсенділік спектрі корсетілген . Бидай дәндериңдегі АБК-АО ферментінің белсенділігіне тәмемлі температура мен ылғалдылықтың өсері салыстырмалы зерттелді.Мезгілінен ерте өнуге тұракты сұрыптар аңықталып, осы құбылысты дәл аныктайтын биохимиялық әдіс жасалды.

Summary

The effect of higher moisture and lower temperature on AAO3 activity in the grain of diverse wheat cultivars are studied and compared. The PHS-resistant wheat cultivars are established. The precision biochemical method of diagnose to PHS is developed.